

药用植物分子农场研究进展

孙卉, 张春义, 姜凌*

中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

摘要: 植物分子农场可以利用植物生产具有药物用途的重组蛋白或者次生代谢化合物,应用广泛。随着对动植物中具有药物用途的代谢途径的深入解析,代谢途径中关键限速酶或调控蛋白的功能不断被明确,如何选择植物分子农场的底盘植物和遗传改造途径等问题,特别是如何协同提高植物制药产量与品质一直是植物分子农场体系建立中面临的关键科学问题。综述了药用的植物分子农场的最新研究进展,着重介绍了底盘植物的选择与药用植物分子农场的构建策略,以期为提高分子农场应用效果提供有力的科技支撑。

关键词: 药用成分;植物分子农场;蛋白设计;基因编辑

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2022.0156

中图分类号: Q943.2, S567 文献标志码: A

Progress of Plant Molecular Farming in Pharmaceutical Use

SUN Hui, ZHANG Chunyi, JIANG Ling*

Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: Plant molecular farming producing recombinant proteins or secondary metabolic compounds of pharmaceutical uses has great potential to be widely used in different therapeutical situation. With the continuous progress of metabolic pathways involved in pharmaceutical uses in animals and plants, more and more key rate-limiting enzymes or regulatory proteins have been identified. However, how to select the baseplate plant and genetic transformation methods, especially, how to efficiently manufacture high quality of pharmaceuticals from plants and improve the yield has always been one of the key scientific issues. This paper reviewed the key factors for the establishment of plant molecular farming, focused on the application of new technologies such as protein molecular design and gene editing involved in the process, and put forward the latest strategies for the establishment of plant molecular farms, and provided scientific and technological support for improving the efficiency of molecular farms of pharmaceutical uses.

Key words: pharmaceutical uses; plant molecular farming; protein design; gene editing

分子农场这个概念最早于1986年提出,指以微生物和动植物为载体,外源表达具有药物功能的蛋白质(例如疫苗、抗体、激素或细胞因子)和各类化合物(酚类、黄酮类、萜类)[1]。其中利用转基因植物为载体的植物分子农场产品具有广泛的化学多样性,可以应用于食品、饲料、医药和生物材料等领域。以较低成本表达药物用途的蛋白质和生物功能化合物是当前的热点研究领域和新兴科研前沿,在明确药用成分分子积累机制的基础

上,综合考虑目标蛋白的性质、目标基因的表达和其他因素,选择适合的底盘植物和表达系统,能够较快获得转基因植物材料并进行扩繁;然后通过药用成分的提取和纯化,或者直接采收食用,可以获得对人体健康有益的疫苗与抗体、药用蛋白和药用功能的其他化合物;最后通过动物实验和转基因安全评价,将药用的植物分子农场产品应用于市场(图1)[2]。与基于细菌、真菌、昆虫或哺乳动物细胞培养的传统系统相比,植物分子无法进

收稿日期:2022-09-01; 接受日期:2022-10-11

基金项目:国家自然科学基金项目(31870283);中国农业科学院创新工程项目(CAAS-ZDRW202010)。

联系方式:孙卉 E-mail: sunhui@caas.cn; *通信作者 姜凌 E-mail: jiangling@caas.cn

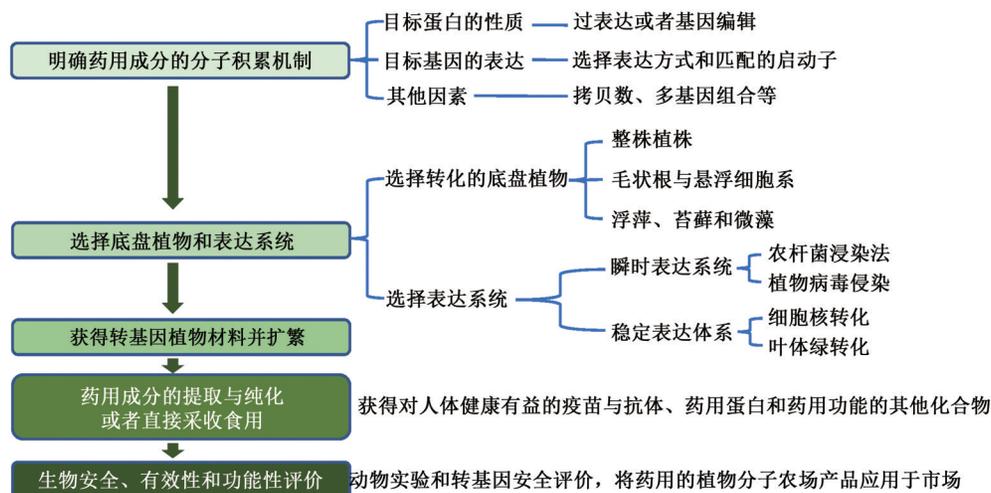


图1 药用植物分子农场基本框架

Fig. 1 Basic framework for pharmaceutical plant molecular farm

行哺乳动物病毒的复制,不会让人们感染人畜共患病或者动物病毒,而且还能确保非天然蛋白质的正确组装、折叠和糖基化,具有更灵活的可扩展性^[3-4]。植物分子农场的底盘植物选择和遗传改造方式选择一直是研究者面临的挑战,同时如何提高植物制药产量与品质也是植物分子农场体系构建过程中面临的关键科学问题之一。本文综述了药物植物分子农场的构建过程进展,着重介绍了分子设计和基因编辑等新兴技术在植物分子农场的应用,提出了建立植物分子农场的最新策略,以期为提高人为设计药用植物分子农场产出效率提供新的研究思路。

1 分子农场中的底盘植物

植物是食品和药品的天然制造农场。植物分子农场可以大规模快速且条件可控地生产药物,因此成为应对突发疫情危机的良好技术措施。选择合适的底盘类型,仅需6~8周就可以应用于治疗药物或疫苗的生产,而常规动物疫苗制备需要6个月(表1)^[1]。用于植物分子农场的材料可以是整株植物,如烟草、大米和大豆,也可以是其他基于植物的系统,例如悬浮植物细胞或者特定的组织培养、水生植物、苔藓、藻类,甚至是来自植物细胞的体外转录和翻译系统^[5]。

1.1 整株植物

使用整个植物作为植物分子农场底盘材料时,通常是以叶片或者种子作为存储组织。烟草、

莴苣、苜蓿和大豆叶片由于其生物量大和高含量的可溶性蛋白质,目前已被广泛应用于生产高水平的重组蛋白质(表1),例如埃博拉病毒抗体、艾滋病抗体和胰岛素原等^[6-9]。种子也是产生药用蛋白质的重要来源,特别是在发展中国家,可以增加穷人获得关键药物的机会,减少对发酵罐和冷链储存和分销的限制,进一步降低了植物分子农场的总体成本。目前玉米、大麦、水稻和小麦等谷物是积累高水平蛋白质的重要粮食作物,其中玉米可用于生产艾滋病病毒抗体,大麦可用于生产细胞生长因子,大豆可用于生产疫苗和凝血因子,水稻可用于生产溶菌酶和乳铁蛋白等^[10-15]。

1.2 毛状根与悬浮细胞系

毛状根是一种不定根的肿瘤性增殖,由植物细胞与革兰氏阴性土壤细菌发根农杆菌自然转化而成。发根来自农杆菌根诱导质粒的T-DNA片段稳定插入宿主植物的核基因组。T-DNA序列两个边界之间的起始位点可以被具有药用价值的异源基因所替代。成熟的毛状根培养物具有在液体培养基和无菌条件下无限期繁殖的优势,并且不会在周围环境中传播外源基因^[16]。目前药用植物的毛状根具有较高的生物合成能力,与传统体外培养相比,在植物次级代谢产物上具有更高的遗传和生化稳定性^[17]。例如在胡萝卜中提高酚类、黄酮类和槲皮素含量^[18],金盏花中提高酚酸和黄酮类含量^[19],茄科赛莨菪中提高莨菪碱、山莨菪碱和东莨菪碱等化合物的含量^[20],板蓝根中提高黄酮类含量^[21]等。毛状根还可以通过外源激发

表1 不同类型分子农场的优缺点

Table 1 Advantages and disadvantages cons of different types of molecular farms

类型	优点	缺点
细菌	快速繁殖、无场所限制	需要诱导才能产生产物、有治疗风险、无法产生复杂产品
酵母	快速增殖、无场所限制、蛋白质产量高	需要诱导才能产生产物
动物细胞培养	周期长、类人蛋白修饰、蛋白质产量高、无场所限制	维护和生产成本高、需要诱导才能产生产物、产生的蛋白大小有限制、有治疗风险
植物细胞培养	周期短、维护和生产成本低、蛋白质产量高	需要诱导才能产生产物、产生的蛋白大小有限制、聚糖修饰可能导致过敏反应
拟南芥	生物信息完整、基因组小、表达系统简单且成熟	不适用于商业大规模应用生产
紫花苜蓿和三叶草	产量高、用于动物疫苗、容易繁殖	存在过多草酸、叶片中蛋白质稳定性较低
烟草	产量高、表达系统成熟、可以快速扩大规模	存在有害生物碱、叶片中蛋白质稳定性较低
油菜和红花	油体纯化技术适合脂溶性产物	生物量低、聚糖修饰与油体积累不匹配
番茄	可食用、温室栽培	培育成本高、需冷藏、受季节影响
土豆和胡萝卜	可食用、特定的储藏器官	食用前必须煮熟、淀粉含量较高
豌豆、大豆和花生	蛋白质含量高、生产成本低	表达水平低
小麦和大麦	储藏期间的产物稳定、生产成本低	需考虑粮食作物安全问题、产量低、转化难度高
水稻和玉米	储藏期间的产物稳定、产量高、提取方便、生物信息完整、表达系统成熟易于转化、生产成本低	需考虑粮食作物安全问题、聚糖修饰可能导致过敏反应

剂^[22]、人工多倍体^[23]和CRISPR/Cas9基因编辑^[24]等方法大规模生产次级代谢产物。

悬浮细胞系比毛状根更容易控制生产条件。目前在烟草悬浮细胞系BY2中可以便捷地添加稳定剂来提高蛋白质稳定性,实现高产,例如在烟草BY-2细胞中生产的人血清白蛋白产量高达11.88 mg·mL⁻¹^[25],生产青蒿素的产量高于120 mg·kg⁻¹鲜重^[26]。还可以通过基因编辑突变BY-2细胞用于生成“聚糖友好”的底盘植物,重组蛋白不含植物复合型聚糖^[27]。烟草NT-1细胞(CONCERT系统)可以生产经美国农业部批准作为兽医疫苗的分子农业产品——血凝素神经氨酸酶糖蛋白^[28]。烟草悬浮细胞ZMapp可以生产治疗埃博拉出血热的3种单克隆抗体组成的混合物^[29]。另外,胡萝卜悬浮细胞ElelysoTM已用于生产美国食品和药物管理局批准的第一种用于人类的分子农业产品——葡萄糖脑苷脂酶,这种蛋白可用于治疗一种家族性糖脂代谢疾病——戈谢病^[30]。

1.3 浮萍、苔藓和微藻

浮萍是水生高等植物,具有生长繁殖快、易于采收、蛋白质含量高和可有效表达复杂蛋白质的优势,目前已经用于生产聚糖工程单克隆抗体、生物仿制药和兽药^[4]。苔藓,特别是小立碗藓能够

在大型光生物反应器环境中表达复杂的人类重组蛋白^[31]。莱茵衣藻是研究最多的微藻物种之一,目前已有专用于克隆和表达重组DNA的分子工具包^[32],能够表达抗癌症的免疫毒素蛋白、针对单纯疱疹病毒糖蛋白D的大型单链抗体和糖尿病相关的谷氨酸脱羧酶。以上几类植物分子农场还需要优化适合最大化生长规模、均匀气体交换和光扩散的光生物反应器^[5]。

2 药用植物分子农场的构建策略

药用的植物分子农场主要是利用植物分子农场生产药物用途的化合物,例如疫苗与抗体、药用蛋白和生物功能化合物。与微生物和动物体系相比,植物只需要土壤、光和水等条件就可以生成药用化合物,价格相对便宜,并且随着密码子优化、细胞特异性启动子和N-聚糖的人源化以及遗传改造方式的技术进步,大大提高了植物的生产率,例如瞬时转染技术使得转染植株短短数日内就可以收获,效率较高。因此,药用植物分子农场的快捷性使其特别适合个性化医疗^[1]。值得注意的是,每类植物分子农场根据其产物的不同,其构建策略也各有侧重。

2.1 疫苗与抗体

药用的植物分子农场主要通过过量表达系统(瞬时或稳定表达均可)生产多种疫苗和抗体,例如非霍奇金淋巴瘤抗体、来自细菌和病毒的其他抗原决定簇,如炭疽、狂犬病、白喉、破伤风、结核病、疟疾等^[33-34]。莴苣可以生产艾滋病免疫原性蛋白、鼠疫疫苗的免疫原性F1-V融合蛋白、霍乱毒素B亚单位等^[35]。烟草悬浮细胞ZMapp生产的3种鼠源单克隆抗体混合药物,可对埃博拉病毒外糖标记的蛋白提供人工免疫应答,目前此药物已经在西非病毒性爆发期间进行了尝试,虽然只有7名患者参与,但其中5名患者最终康复^[29,36]。拟南芥可以用于生产免疫原性蛋白^[11]、葡萄糖苷酶^[37]和传染性法氏囊病病毒的免疫原性VP2蛋白^[38]。水稻胚乳也可以生产预防腹泻病的可食用疫苗、屋尘螨抗原、幽门螺杆菌抗原、日本脑炎病毒包膜蛋白、艾滋病毒和轮状病毒的抗体等^[39]。最新的药用植物分子农场在疫苗和抗体的应用产品是新型冠状病毒疫苗CoVLP,这是目前全球唯一的植物性新型冠状病毒疫苗^[40]。2021年启动了该疫苗在美国食品药品监督管理局和英国药监机构的注册申报程序,2022年2月24日,加拿大卫生部批准了这款疫苗,商品名COVIFENZ[®],该疫苗也成为世界首个获批的植物源新型冠状病毒疫苗。加拿大已成为全球第一个授权使用基于植物的新型冠状病毒疫苗的国家^[39]。

2.2 药用蛋白

1986年,在植物中生产的第一种药用植物蛋白质是通过在烟草和向日葵愈伤组织中表达的人类生长激素^[41]。1990年,在转基因烟草和马铃薯中生产了另一种重组蛋白,即人血清白蛋白^[42]。治疗戈谢病葡萄糖脑苷脂酶已成为药用植物分子农场应用的成功案例之一,该酶通过把蛋白质导向液泡来防止末端甘露糖残基的延伸,从而促进人体巨噬细胞对酶的吸收^[43]。用于治疗1型糖尿病的重组人胰岛素原也是在烟草和莴苣中生产的^[7]。水稻种子也为植物制药提供了巨大的应用潜力,常作为口服给药的生产系统^[14]。更多的可食用植物(如番茄)正在越来越广泛地应用于口服治疗性蛋白的生产,例如肿瘤坏死因子拮抗剂、人 α -抗胰蛋白酶、纤维生长因子、人溶菌酶、乳铁蛋白、人生长激素、人白细胞介素和人酸性 α -葡萄糖苷酶等各种重组药物蛋白^[14]。上述药用蛋白的

生产主要在植物不同的组织器官中通过过量表达系统来实现。

2.3 药用功能的其他化合物

药用的植物分子农场也能生产包括酚类、黄酮类、萜类、皂苷类等很多具有药用功能的植物次生代谢物,相对于普通植物,药用植物(整个植株、毛状根或悬浮细胞)也是常用的底盘植物,可以用来提高植物中药用次生代谢物含量。为了加速解析药用植物次生代谢物积累的分子机制,生物学家一方面开发了DNA条形码,可识别药用植物的遗传多样性及其在属和种水平上的准确分类^[44];另一方面通过简化基因组测序和转录组分析,可以识别有价值的生物合成途径中的关键基因和酶,以及快速准确地进行种群分类。目前全基因组关联分析适用于检测植物中数量性状基因座,使其整个基因组覆盖着高密度的单核苷酸多态性标记^[45]。在构建生产药用功能化合物的植物分子农场时,需要在明确有效药用成分分子积累机制的基础上,综合考虑目标蛋白的性质、目标基因的表达和其他因素以优化构建策略,通过设计药用植物次生代谢调控手段,提高有效成分合成积累和药用价值,同时还要考虑制药产量和品质的平衡。首先,可以通过遗传转化将整条生产代谢物的代谢通路转移到底盘植物中,使化合物在更容易富集的植物中聚集。例如将参与青蒿素生物合成途径的多个基因转化到烟草中,不仅显著增加了烟草中青蒿素的产量,而且烟草本身产量可观,从而能够大幅度降低青蒿素的生产成本^[26]。其次,可以根据目标蛋白与化合物积累的关系,特异性阻断目标蛋白的功能,使底盘植物趋向药用化合物的方向积累。此外,还可以引入TALENs、ZFNs和CRISPR-Cas9系统的靶向基因组编辑的方法,创造包含所需化合物和/或新生物产品的药用植物^[46]。例如丹参中迷迭香酸合酶基因的抑制导致3,4-二氢羟基苯乳酸的水平增加,迷迭香酸的质量也有所提升^[47]。通过CRISPR敲除二萜合酶基因导致丹参酮含量降低,发现二萜合酶基因是丹参酮生物合成中的关键基因^[48]。在长春花中,香叶基(香叶基)二磷酸合酶和香叶醇合酶基因的过度表达导致转基因植物中长春碱和长春新碱的含量显著增加^[49]。盾叶薯蓣中法尼基焦磷酸合酶基因的靶向突变使其酶学活性降低,导致角鲨烯的含量比野生型植物低1.6倍^[50]。在人参毛

状根中,通过基因编辑调控三萜类皂苷代谢工程以及木质部合成(苯丙氨酸解氨酶)基因表达,抑制了稀有人参皂苷 R_g₃合成的侧支途径,能够显著提升 R_g₃含量,产量可达到 83.6 mg·L⁻¹[51]。为增加药用植物生产化合物的能力,可以用串并联的间歇浸没生物反应器培养系统来提高悬浮细胞、组织器官或者全株植物培养的通量[52]。再次,智能蛋白质分子设计手段也能够应用于药用植物分子农场的设计策略上,例如通过分子对接技术发现提高牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合酶活性的关键位点,再结合转基因技术可显著提升烟草中的胡萝卜素含量[53]。第四,利用药用植物分子农场生产人工 miRNA,例如将 2 种针对乙型肝炎病毒设计的人工 miRNA,遗传转化生菜后饲喂给患病小鼠,能够有效降低病毒的表达和肝损伤,且无不良反应,这种表达人工 miRNA 的生菜未来可能成为保健营养蔬菜,并有望成为未来人类防治乙肝病毒感染的有效方法[54]。最后,氨基酸形成的短肽也可以在植物分子农场中大规模生产,利用粮食作物(如水稻)可以大幅增加药物的产量。例如利用水稻胚乳生产糖蛋白激素人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子,可用于化疗和骨髓移植后恢复淋巴细胞,治疗失血性休克、水肿和烧伤[55]。水稻胚乳生产的嵌合型多重降压肽,能够显著降低高血压大鼠的血压,且无明显副作用[56]。

3 展望

综上所述,利用药用植物分子农场生产药物希望与挑战并存。近年来,应用植物分子农场生产治疗慢性病和传染病的酶、生长因子、抗体、疫苗和药物[57],其良好的安全性让植物衍生药物更受市场欢迎[58]。提高药用植物分子农场的效能还需要考虑以下几点。首先,动物和植物之间在高尔基体发生 O-聚糖和 N-聚糖修饰上存在差异,而且植物缺乏 N-乙酰神经氨酸,因此不能进行真正的 N-糖基化,这是阻碍植物单克隆抗体用于治疗的原因之一[59]。已有研究发现植物糖基化抗体可能会导致受试者的免疫原性和过敏[60],因此需要根据分子农场的实际情况进一步细化研发工作,综合考虑如何减少与植物药物相关的免疫原性和过敏性疾病,进一步加强聚糖修饰工程研究,确保产生能够进行类似于人体细胞的真实糖基化的植

物株系。其次,药用植物富含次生代谢产物,一方面分子农场可以生产大量的目标产品,另一方面药用植物的组织中可能存在少量有毒生物碱。根据其使用生产系统(全植物、植物组织或细胞悬浮液),对应蛋白质提取和纯化需要收获植物材料、除去杂质。如何快速高效地获得有效目标产物是研发应用生产的重点,因此需要考虑更优化的提取/纯化方法,最大程度减少异源蛋白质的蛋白水解趋势[58,61]。最后,构建药用的植物分子农场还需要考虑产量与品质的平衡。为了提高产量,需要选择合适的底盘植物,或者使用间歇浸没生物反应器或者大面积种植粮食作物[26,52,55-56]。由于大田作物很容易受到生物因素(害虫和疾病)以及气候和天气条件等非生物因素的影响,用于药物用途的作物生产需要良好的生产规范与转基因植物监管。药用的植物分子农场还可以考虑全自动化的“立体农业”,所有植物分层种植,每层都包含各自的照明和肥料供应系统,与无土生长基质和水培或气培灌溉系统结合使用,或者采用全封闭设计,使植物生长与当地环境和气候隔绝[62]。

当前研究发现,让人们获得药用的植物分子农场产品最经济的方法是将重组蛋白靶向植物的可食用部分,直接在饮食体系中传递,然后进行浓缩和/或工业包装,不需要任何纯化步骤。此外,还需要克服蛋白质生产水平低和水解率高等因素,以及与转基因可能扩散到非靶标生物体有关的生物安全和公众可接受性问题。全局性设计药用的植物分子农场需要综合考虑将外源基因稳定插入细胞核或质体基因组以及优化基因表达系统,提高翻译后的稳定性从而提高整体蛋白质产量。选择植物组织、器官或亚细胞器来表达和积累目标蛋白质对最终产品的完整性和功能性有较大影响。随着全球人口的增长,生物制药的需求将大大增加,需要建立更多高效的药用植物分子农场,以满足人类对各种疾病治疗的日益增长的需求。

参 考 文 献

- [1] FAUSTHER-BOVENDO H, KOBINGER G. Plant-made vaccines and therapeutics[J]. *Science*, 2021, 373(6556): 740-741.
- [2] NOGUEIRA M, ENFISSI E M, ALMEIDA J, *et al.* Creating plant molecular factories for industrial and nutritional isoprenoid production[J]. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2018, 49: 80-87.
- [3] YUSIBOV V, STREATFIELD S J, KUSHNIR N. Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals:

- vaccines, antibodies and beyond[J]. *Hum. Vaccin.*, 2011, 7(3): 313-321.
- [4] PAUL M, MA J K. Plant-made pharmaceuticals: leading products and production platforms[J]. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2011, 58(1): 58-67.
- [5] FISCHER R, BUYEL J F. Molecular farming-the slope of enlightenment[J/OL]. *Biotechnol. Adv.*, 2020, 40: 107519 [2020-01-13]. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107519>.
- [6] GRECO R, MICHEL M, GUETARD D, *et al.* Production of recombinant HIV-1/HBV virus-like particles in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants for a bivalent plant-based vaccine[J]. *Vaccine*, 2007, 25(49): 8228-8240.
- [7] BOYHAN D, DANIELL H. Low-cost production of proinsulin in tobacco and lettuce chloroplasts for injectable or oral delivery of functional insulin and C-peptide[J]. *Plant Biotechnol. J.*, 2011, 9(5): 585-598.
- [8] GOVEA-ALONSO D O, RUBIO-INFANTE N, GARCIA-HERNANDEZ A L, *et al.* Immunogenic properties of a lettuce-derived C4(V3) 6 multi-epitopic HIV protein[J]. *Planta*, 2013, 238(4): 785-792.
- [9] BISHOP B M. Potential and emerging treatment options for Ebola virus disease[J]. *Ann. Pharmacother.*, 2015, 49(2): 196-206.
- [10] SABALZA M, VAMVAKA E, CHRISTOU P, *et al.* Seeds as a production system for molecular pharming applications: status and prospects[J]. *Curr. Pharm. Des.*, 2013, 19(31): 5543-5552.
- [11] SABALZA M, MADEIRA L, VAN DOLLEWEERD C, *et al.* Functional characterization of the recombinant HIV-neutralizing monoclonal antibody 2F5 produced in maize seeds[J]. *Plant Mol. Biol.*, 2012, 80(4-5): 477-488.
- [12] HUDSON L C, GARG R, BOST K L, *et al.* Soybean seeds: a practical host for the production of functional subunit vaccines[J/OL]. *Biomed. Res. Int.*, 2014, 2014: 340804 [2014-04-14]. <https://doi.org/10.1155/2014/340804>.
- [13] CUNHA N B, MURAD A M, RAMOS G L, *et al.* Accumulation of functional recombinant human coagulation factor IX in transgenic soybean seeds[J]. *Transgenic Res.*, 2011, 20(4): 841-855.
- [14] WAKASA Y, TAKAIWA F. The use of rice seeds to produce human pharmaceuticals for oral therapy[J]. *Biotechnol. J.*, 2013, 8(10): 1133-1143.
- [15] FAYE L, GOMORD V. Success stories in molecular farming-a brief overview[J]. *Plant Biotechnol. J.*, 2010, 8(5): 525-528.
- [16] GUILLON S, TREMOUILLAX-GUILLER J, PATI P K, *et al.* Hairy root research: recent scenario and exciting prospects-commentary[J]. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2006, 9(3): 341-346.
- [17] ROYCHOWDHURY D, HALDER M, JHA S. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation in medicinal plants: genetic stability in long-term culture[M]//JHA S (ed). *Transgenesis and secondary metabolism. Reference series in phytochemistry*. Springer, Cham., 2016: 1-23. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27490-4_8-1.
- [18] BALASUBRAMANIAN M, ANBUMEGALA M, SURENDRAN R, *et al.* Elite hairy roots of *Raphanus sativus* (L.) as a source of antioxidants and flavonoids[J]. *3Biotech*, 2018, 8(2):128.
- [19] KUNDU S, SALMA U, ALI M N, *et al.* Development of transgenic hairy roots and augmentation of secondary metabolites by precursor feeding in *Sphagneticola calendulacea* (L.) Pruski[J]. *Ind. Crop Prod.*, 2018, 121: 206-215.
- [20] LAN X, ZENG J, LIU K, *et al.* Comparison of two hyoscyamine 6 β -hydroxylases in engineering scopolamine biosynthesis in root cultures of *Scopolia lurida*[J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2018, 497(1): 25-31.
- [21] JIAO J, GAI Q Y, WANG W, *et al.* Remarkable enhancement of flavonoid production in a co-cultivation system of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures and immobilized *Aspergillus niger*[J]. *Ind. Crop Prod.*, 2018, 112: 252-261.
- [22] KASTELL A, SCHREINER M, KNORR D, *et al.* Influence of nutrient supply and elicitors on glucosinolate production in *E. sativa* hairy root cultures[J]. *Plant. Cell Tissue Organ. Cult.*, 2018, 132(3): 561-572.
- [23] DEHGHAN E, HÄKKINEN S T, OKSMAN-CALDENTY K M, *et al.* Production of tropane alkaloids in diploid and tetraploid plants and *in vitro* hairy root cultures of *Egyptian henbane (Hyoscyamus muticus L.)* [J]. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.*, 2012, 110(1): 35-44.
- [24] CAI Y, CHEN L, LIU X, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated genome editing in soybean hairy roots[J/OL]. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0136064 [2015-08-18]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136064>.
- [25] SUN Q Y, DING L W, LOMONOSSOFF G P, *et al.* Improved expression and purification of recombinant human serum albumin from transgenic tobacco suspension culture[J]. *J. Biotechnol.*, 2011, 155(2): 164-172.
- [26] FUENTES P, ZHOU F, ERBAN A, *et al.* A new synthetic biology approach allows transfer of an entire metabolic pathway from a medicinal plant to a biomass crop[J/OL]. *Elife*, 2016, 5: e13664[2016-06-14]. <https://doi.org/10.7554/eLife.13664>.
- [27] MERCX S, SMARGIASSO N, CHAUMONT F, *et al.* Inactivation of the $\beta(1,2)$ -xylosyltransferase and the $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferase genes in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells by a multiplex CRISPR/Cas9 strategy results in glycoproteins without plant-specific glycans[J/OL]. *Front. Plant Sci.*, 2017, 8: 403 [2017-03-27]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00403>.
- [28] SCHILLBERG S, RAVEN N, FISCHER R, *et al.* Molecular farming of pharmaceutical proteins using plant suspension cell and tissue cultures[J]. *Curr. Pharm. Des.*, 2013, 19(31): 5531-5542.
- [29] QIU X, WONG G, AUDET J, *et al.* Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp[J]. *Nature*, 2014, 514(7520): 47-53.
- [30] MOR T S. Molecular pharming's foot in the FDA's door: Protalix's trailblazing story[J]. *Biotechnol. Lett.*, 2015, 37(11): 2147-2150.
- [31] DECKER E L, RESKI R. Glycoprotein production in moss bioreactors[J]. *Plant Cell Rep.* 2012, 31(3): 453-460.
- [32] RASALA B A, MUTO M, LEE P A, *et al.* Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Plant Biotechnol. J.*, 2010, 8(6): 719-733.
- [33] PUJOL M, GAVILONDO J, AYALA M, *et al.* Fighting cancer with plant-expressed pharmaceuticals[J]. *Trends Biotechnol.*, 2007, 25(10): 455-459.
- [34] SHARMA A K, SHARMA M K. Plants as bioreactors: recent

- developments and emerging opportunities[J]. *Biotechnol. Adv.*, 2009, 27(6): 811-832.
- [35] MOUSTAFA K, ABDULLAH M A, TRÉMOUILLAUX-GUILLER J. Molecular farming on rescue of pharma industry for next generations[J]. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2016, 36(5): 840-850.
- [36] NA W, PARK N, YEOM M, *et al.* Ebola outbreak in Western Africa 2014: what is going on with Ebola virus?[J] *Clin. Exp. Vaccine Res.*, 2015, 4(1): 17-22.
- [37] HE X, GALPIN J D, TROPAK M B, *et al.* Production of active human glucocerebrosidase in seeds of *Arabidopsis thaliana* complexglycan-deficient (*cgl*) plants[J]. *Glycobiology*, 2012, 22(4): 492-503.
- [38] WU H, SINGH N K, LOCY R D, *et al.* Expression of immunogenic VP2 protein of infectious bursal disease virus in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Biotechnol. Lett.*, 2004, 26(10): 787-792.
- [39] ZHU Q, TAN J, LIU Y G. Molecular farming using transgenic rice endosperm[J]. *Trends Biotechnol.*, 2022, 4(10):1248-1260.
- [40] WARD B J, MAKARKOV A, SÉGUIN A, *et al.* Efficacy, immunogenicity, and safety of a plant-derived, quadrivalent, virus-like particle influenza vaccine in adults (18-64 years) and older adults (≥ 65 years): two multicentre, randomised phase 3 trials[J]. *Lancet*, 2020, 396(10261):1491-1503.
- [41] BARTA A, SOMMERGRUBER K, THOMPSON D, *et al.* The expression of a nopaline synthase-human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue[J]. *Plant Mol. Biol.*, 1986, 6(5): 347-357.
- [42] SIJMONS P C, DEKKER B M, SCHRAMMEIJER B, *et al.* Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants[J]. *Biotechnol.*, 1990, 8(3): 217-221.
- [43] SHAALTIEL Y, BARTFELD D, HASHMUELI S, *et al.* Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system[J]. *Plant Biotechnol. J.*, 2007, 5(5): 579-590.
- [44] TECHEN N, PARVEEN I, PAN Z, *et al.* DNA barcoding of medicinal plant material for identification[J]. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2014, 25: 103-110.
- [45] EDWARDS D, BATLEY J. Plant genome sequencing: applications for crop improvement[J]. *Plant Biotechnol. J.*, 2010, 8(1): 2-9.
- [46] POUVREAU B, VANHERCKE T, SINGH S. From plant metabolic engineering to plant synthetic biology: the evolution of the design/build/test/learn cycle[J]. *Plant Sci.*, 2018, 273: 3-12.
- [47] ZHOU Z, TAN H, LI Q, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis of RAS in *Salvia miltiorrhiza*[J]. *Phytochem.*, 2018, 148: 63-70.
- [48] LI B, CUI G, SHEN G, *et al.* Targeted mutagenesis in the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza*[J/OL]. *Sci. Rep.*, 2017, 7: 43320 [2017-03-03]. <https://doi.org/10.1038/srep43320>.
- [49] KUMAR S R, SHILPASHREE H B, NAGEGOWDA D A. Terpene moiety enhancement by overexpression of geranyl (geranyl) diphosphate synthase and geraniol synthase elevates monomeric and dimeric monoterpene indole alkaloids in transgenic *Catharanthus roseus*[J/OL]. *Front. Plant Sci.*, 2018, 9: 942 [2018-06-06]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00942>.
- [50] FENG S, SONG W, FU R, *et al.* Application of the CRISPR/Cas9 system in *Dioscorea zingiberensis*[J]. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.*, 2018, 135:133-141.
- [51] YAO L, ZHANG H, LIU Y, *et al.* Engineering of triterpene metabolism and overexpression of the lignin biosynthesis gene *PAL* promotes ginsenoside Rg3 accumulation in ginseng plant chassis[J]. *J. Integr. Plant Biol.* 2022, 64(9): 1739-1754.
- [52] DONG C, QU G, GUO J, *et al.* Rational design of geranylgeranyl diphosphate synthase enhances carotenoid production and improves photosynthetic efficiency in *Nicotiana tabacum*[J]. *Sci. Bull.*, 2022, 67(3): 315-327.
- [53] VALDIANI A, HANSEN O K, NIELSEN U B, *et al.* Bioreactor based advances in plant tissue and cell culture: challenges and prospects[J]. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2019, 39 (1): 20-34.
- [54] LEI L. Lettuce-manufactured pharmaceuticals[J]. *Nat. Plants*, 2019, 5(7): 646-646.
- [55] ALUKO R E. Antihypertensive peptides from food proteins[J]. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 2015, 6: 235-262.
- [56] QIAN D, QIU B, ZHOU N, *et al.* Hypotensive activity of transgenic rice seed accumulating multiple antihypertensive peptides[J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2020, 68(27): 7162-7168.
- [57] STOGER E, FISCHER R, MOLONEY M, *et al.* Plant molecular pharming for the treatment of chronic and infectious diseases[J]. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2014, 65: 743-768.
- [58] NIAZIAN M, SADAT NOORI S A, TOHIDFAR M, *et al.* Essential oil yield and agro-morphological traits in some Iranian ecotypes of ajowan (*Carum copticum* L.)[J]. *J. Essent. Oil Bear. Plants*, 2017, 20(4): 1151-1156.
- [59] OBEMBE O O, POPOOLA J O, LEELAVATHI S, *et al.* Advances in plant molecular farming[J]. *Biotechnol. Adv.*, 2011, 29(2): 210-222.
- [60] FISCHER R, SCHILLBERG S, HELLWIG S, *et al.* GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins[J]. *Biotechnol. Adv.*, 2012, 30(2): 434-439.
- [61] BOIVIN S, KOZAK S, MEIJERS R. Optimization of protein purification and characterization using ThermoFluor screens[J]. *Protein Expr. Purif.*, 2013, 91(2): 192-206.
- [62] HUEBBERS J W, BUYEL J F. On the verge of the market-plant factories for the automated and standardized production of biopharmaceuticals[J/OL]. *Biotechnol. Adv.*, 2021, 46: 107681[2021-12-14]. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107681>.